

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/13609 (43) Date de publication internationale: 9 mai 1996 (09.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01422 (22) Date de dépôt international: 27 octobre 1995 (27.10.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/12972 28 octobre 1994 (28.10.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]; 1, rue Robert-et-Sonia-Delaunay, F-75011 Paris (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): PEPONNET, Christine [FR/FR]; 86, rue du Faubourg-Saint-Denis, F-75010 Paris (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: SOLID-PHASE NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD AND REAGENT KIT THEREFOR (54) Titre: PROCEDE D'AMPLIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES EN PHASE SOLIDE ET TROUSSE DE REACTIFS UTILE POUR LA MISE EN ŒUVRE DE CE PROCEDE (57) Abstract <p>A solid-phase nucleic acid amplification method using a primer immobilised on a functionalised heat-resistant solid support, wherein said primer is immobilised on the solid support via a linking arm consisting of a polyfunctional molecule which forms a covalent bond between the solid support and a first functional group of said polyfunctional molecule, and between the 5' end of said primer and a second functional group of said polyfunctional molecule.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un procédé d'amplification d'acides nucléiques en phase solide dans lequel on utilise une amorce immobilisée sur un support solide thermo-résistant fonctionnalisé, caractérisé en ce que ladite amorce est immobilisée sur le support solide par l'intermédiaire d'un bras de liaison consistant en une molécule polyfonctionnelle établissant un lien covalent entre le support solide et un premier groupe fonctionnel de ladite molécule polyfonctionnelle, et entre l'extrémité 5' de ladite amorce et un deuxième groupe fonctionnel de ladite molécule polyfonctionnelle.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE D'AMPLIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES EN PHASE SOLIDE ET
TROUSSE DE REACTIFS UTILE POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

La présente invention concerne un procédé d'amplification
5 d'acides nucléiques en phase solide, ainsi qu'une trousse de réactifs utile
pour la mise en œuvre du procédé.

La présente invention a également pour objet un procédé
d'immobilisation d'une amorce sur phase solide.

10

L'amplification sur une phase solide consiste en l'élongation, au
cours d'une réaction de PCR ou d'autres types d'amplifications, telle que
LCR, SDA etc... d'une amorce préalablement fixée à un support solide. Une
telle technique permet d'obtenir un produit d'amplification dont un brin
15 spécifique est attaché de façon covalente à la phase solide, sans avoir
recours à d'autres étapes que la PCR. Ceci permet d'effectuer la détection
avant dénaturation sur de l'ADN double brin, ou après dénaturation sur un
brin spécifique du produit d'amplification en enchainant PCR et détection
sans changer de support.

20

Des méthodes d'amplification d'acides nucléiques en phase solide
ont été décrites dans WO 89/11546, AU 47144/89 et WO 93/09250.

Ce type d'amplification sur support peut être très utile pour toutes
25 les applications de diagnostic en biologie moléculaire, notamment pour la
détection de cibles infectieuses ou de cibles génomiques. Cette technique
permet de réduire les temps de détection de même que les risques
d'erreurs, puisque l'échantillon n'est pas transféré d'un puits à un autre
mais que toute l'expérience se passe sur le même support. Par ailleurs,
30 pour toutes les applications ne nécessitant qu'un seul brin spécifique
d'ADN, comme le clonage ou le séquençage, cette technique peut permettre
un réel gain de temps et une grande facilité d'utilisation évitant beaucoup
d'étapes intermédiaires.

35

L'amorce participant à la PCR fixée par son extrémité 5' au support solide doit faire partie du brin que l'on souhaite allonger sur le support solide. L'extrémité 3' de l'amorce doit être libre, non modifiée et homologue à la cible pour permettre son extension par une polymérase.

Toutefois, un inconvénient majeur de l'amplification en phase solide est le faible rendement de l'élongation sur la phase solide.

5

Afin de diminuer les interactions stériques support solide-oligonucléotides et d'améliorer l'accessibilité de la Taq polymérase à l'hybride formé par l'amorce fixée et le produit d'amplification complémentaire, un bras de liaison ou "linker" est placé à l'extrémité 5' de l'amorce fixée. Ce bras de liaison est aussi appelé "bras espaceur" car il sert à éloigner physiquement du support solide l'extrémité 3' de l'amorce fixée pour ne pas gêner la coopération des différents réactifs d'amplification avec l'amorce.

15

On a découvert, selon la présente invention, que l'un des paramètres influençant le rendement d'élongation, réside dans le mode de fixation de l'amorce sur le support solide. Les nucléotides de l'amorce eux-mêmes sont susceptibles d'être impliqués dans une fixation covalente avec le support dans les conditions de couplage utilisées entre le "linker" et le support solide, ce qui contribue au faible rendement d'élongation de l'amorce. Plus précisément, on a découvert que plus que la taille du bras de liaison, c'est la réactivité ou la multiplicité des sites potentiels de fixation du bras de liaison sur le support qui augmente le rendement d'élongation de l'amorce.

25

La présente invention a pour objet un procédé d'amplification d'acides nucléiques en phase solide dans lequel on utilise une amorce immobilisée sur un support solide thermo-résistant fonctionnalisé, caractérisé en ce que ladite amorce est immobilisée sur le support solide par l'intermédiaire d'un lien covalent entre le support solide et un groupe fonctionnel d'une molécule polyfonctionnelle, ladite molécule étant elle-même liée à l'extrémité 5' de ladite amorce.

30

Plus précisément ladite amorce est immobilisée sur le support solide par l'intermédiaire d'un bras de liaison (ou "linker") consistant en un reste de ladite molécule polyfonctionnelle intercalé entre le support solide et l'extrémité 5' de l'amorce et établissant un lien covalent entre un
5 groupe fonctionnel du support solide et un premier groupe fonctionnel de ladite molécule polyfonctionnelle, d'une part, et entre l'extrémité 5' de l'amorce et un deuxième groupe fonctionnel de ladite molécule polyfonctionnelle d'autre part.

10 En augmentant le nombre de groupes fonctionnels dans le bras de liaison on augmente le rendement d'élongation. On pense que cela est dû au fait que l'on augmente ainsi la probabilité que la fixation sur le support solide se fasse par l'intermédiaire du bras de liaison, c'est-à-dire sans que l'amorce proprement dite, soit elle-même impliquée.

15 On entend ici par groupe fonctionnel de ladite molécule polyfonctionnelle, un groupe susceptible d'établir un lien covalent avec le support solide. On cite en particulier, comme groupes fonctionnels, les groupes amine, hydroxyl, carboxyl, aldehyde, thiol ou phosphate.

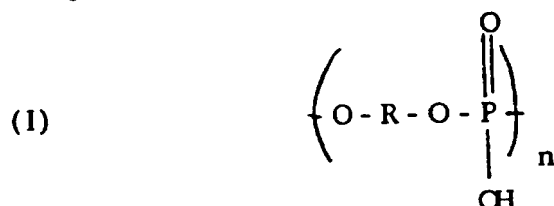
20 Lorsque le bras de liaison comporte un groupe très réactif tel qu'un groupe phosphate terminal à son extrémité non liée à l'amorce, il n'est pas nécessaire que la molécule polyfonctionnelle comporte un nombre élevé de groupes fonctionnels. Toutefois, de préférence ladite molécule
25 polyfonctionnelle comporte au moins cinq, de préférence encore, au moins dix groupes fonctionnels.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite molécule polyfonctionnelle comprend un fragment polymère. De
30 préférence chaque unité monomérique dudit fragment polymère comporte au moins un groupe fonctionnel. Dans ce cas l'augmentation de la taille du bras de liaison, c'est-à-dire du polymère, se traduit par l'augmentation du nombre de sites potentiels de fixation terminale de l'amorce et permet d'augmenter le rendement d'élongation et ce, alors que
35 le taux global de fixation de l'amorce sur le support solide reste constant.

De préférence le fragment polymère rajouté à l'extrémité 5' de ladite amorce comporte plus de 5 monomères de préférence encore plus de 10 monomères, notamment jusqu'à 50 monomères.

5 Avantageusement ledit fragment polymère selon l'invention, comprend un fragment homopolynucléotidique ou un fragment d'un analogue de polynucléotides.

On entend ici par "analogue de polynucléotides" un polymère dont les unités monomériques sont reliées par un lien phosphodiester semblable au lien phosphodiester des polynucléotides naturels. En d'autres termes, il s'agit d'un polymère dans lequel les restes nucléosidiques des monomères nucléotidiques sont remplacés par des restes non nucléosidiques, notamment aliphatiques. On cite en particulier des fragments polymères de formule (I) suivante :



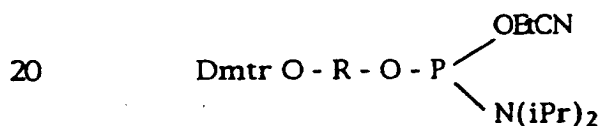
dans laquelle R est un reste aliphatique, notamment de 2 à 20 atomes de carbone, tel qu'un reste alkylène, R comportant au moins un groupe fonctionnel selon l'invention et n est un entier notamment de 2 à 50.

De préférence le fragment polymère de type analogue de polynucléotides selon l'invention comporte plusieurs groupes réactifs greffés sur chaque monomère, en particulier des groupes amine ou hydroxyl, dans ce cas n peut être plus particulièrement compris entre 2 et 10 seulement.

Lorsque le bras de liaison consiste en un fragment homopolynucléotide, il comporte de préférence plus de 5 nucléotides, de préférence encore plus de 10 nucléotides notamment jusqu'à 50 nucléotides.

Les analogues de polynucléotides selon l'invention, peuvent être obtenus par des méthodes de synthèse similaires aux méthodes de synthèse d'ADN, notamment par synthèse automatique sur support solide. En effet, ces fragments polymères peuvent être obtenus par condensation des
5 synthons monomériques adaptés aux procédés de synthèse nucléotidique impliquant l'utilisation de synthons phosphoramidites, c'est-à-dire un synthon comportant de façon classique deux groupes OH terminaux, protégés, l'un par un groupe Diméthoxytrityl (Dmtr) et l'autre par un groupe phosphoramidite. Le fragment polymère de type analogue de
10 polynucléotide correspond alors à la condensation de synthons similaires aux synthons nucléotidiques classiques dans lesquels le reste nucléosidique divalent en 5' et 3', est remplacé par un reste aliphatique, notamment alkylène.

15 Plus particulièrement, pour obtenir les fragments de polymères analogues de polynucléotides de formule (I), on peut utiliser des synthons phosphoramidites de formule :

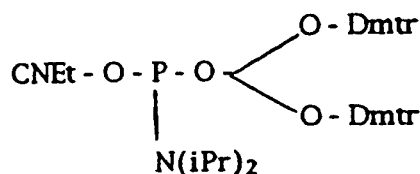


Ainsi lorsque le bras de liaison est un fragment polynucléotide ou analogue de polynucléotide, on peut avantageusement préparer
25 directement par synthèse de type nucléotidique le bras de liaison ou l'amorce conjuguée au bras de liaison, ledit conjugué étant ultérieurement couplé au support solide selon l'invention.

Le fragment polymère, notamment homopolynucléotide ou
30 analogue de polynucléotides, peut être un fragment ramifié, c'est-à-dire comportant plusieurs branches. Ce type de fragment peut être obtenu en utilisant un monomère pouvant servir de base à la condensation avec plusieurs monomères sur le même synthon. On cite en particulier le synthon phosphoramidite suivant (Ref. 5250-1 de Clontech) :

35

6



- 5 qui peut servir dans le procédé de synthèse du type synthèse automatique d'ADN et peut se condenser avec deux monomères en parallèle.

Avantageusement, ledit polymère et en particulier le fragment homopolynucléotidique ou analogue de polynucléotide intercalé entre le support solide et l'amorce comporte à son extrémité qui n'est pas liée à l'amorce, un groupe fonctionnel terminal réactif pouvant établir un lien covalent avec le support solide. On cite en particulier comme dit groupe fonctionnel terminal réactif du fragment polymère, un groupe hydroxyl ou une amine et de préférence encore un groupe phosphate.

15 L'utilisation d'un groupement phosphate terminal est particulièrement recommandée lorsque le bras de liaison est un poly-T. En l'absence de groupe phosphate, un bras de liaison poly-A ou poly-C est plus efficace.

20 Les méthodes de synthèse automatique d'ADN sur support solide permettent de phosphoryler chimiquement l'extrémité 5' terminale de quantités importantes d'oligonucléotides. On peut donc par ces méthodes préparer des bras de liaison de type homopolynucléotides ou analogues de polynucléotides ou des conjugués de ces bras de liaison et de l'amorce, phosphorylés à l'extrémité 5' du bras de liaison.

Selon l'invention, le support solide est constitué de polymère organique ou inorganique fonctionnalisé.

30 Selon la présente invention certaines caractéristiques du support solide sont avantageuses pour pouvoir allonger une amorce oligonucléotidique fixée à un support solide en un produit d'amplification. Tout d'abord, ce support solide doit être thermo-résistant, c'est-à-dire capable de résister aux fortes températures d'une PCR (100°C) et doit avoir

une bonne conduction thermique. Il doit être fonctionnalisé, c'est-à-dire comporter des fonctions chimiques, afin de permettre la fixation stable d'une amorce oligonucléotidique sur le support solide. Cette liaison amorce-support solide doit être également résistante aux fortes
5 températures. C'est pourquoi selon la présente invention, une liaison covalente est préférée. La Taq polymérase ou autre enzyme responsable de l'élongation ne doit pas être inhibée par des composants du support. Enfin, un tel support doit avoir des propriétés optiques permettant une détection colorimétrique ou fluorescente sans bruit de fond. Un support transparent
10 est préféré car il permet l'utilisation de tous les types de lecteurs.

On utilise donc de préférence des types de plastique qui possèdent une grande résistance aux fortes températures. On cite en particulier les matières plastiques, notamment à base de polystyrène modifié thermo-
15 résistant, de copolymère styrène-acrylonitrile, de polycarbonate, de polypropylène ou de verre.

On peut utiliser des supports plastiques solides fonctionnalisés par traitement UV pour induire l'apparition de groupes fonctionnels NH_2 (ref.
20 1). Toutefois, selon la présente invention, le support solide peut être un support polyfonctionnalisé c'est-à-dire comportant une multiplicité de groupes fonctionnels, notamment aldéhyde, carboxyl, amine, hydroxyl ou thiol qui favorisent l'établissement d'un lien covalent stable avec le bras de liaison consistant dans ladite molécule polyfonctionnelle liée à
25 l'amorce.

De façon appropriée, on utilise des supports plastiques qui ont été traités par traitement corona ou irradiation gamma pour induire l'apparition d'une multiplicité de groupes fonctionnels. Ce type de
30 traitement est aisé et évite l'utilisation de réactifs chimiques de fonctionnalisation.

Comme support thermo-résistant préféré on utilise en particulier du polycarbonate ou un copolymère de styrène-acrylonitrile
35 fonctionnalisés entre autre par traitement corona ou irradiation gamma.

Des méthodes de fixation covalente d'oligonucléotides sur des supports solides fonctionnalisés par l'intermédiaire d'un groupe fonctionnel terminal de l'oligonucléotide sont connues (Réf. 1 à 5). Toutefois, selon l'invention, les fragments homopolynucléotidiques
5 peuvent se fixer sur le support solide par les groupes fonctionnels naturels, notamment amine et hydroxyl des bases nucléotidiques elles-mêmes, ou par un groupe fonctionnel terminal notamment phosphate.

De même les fragments de type analogue de polynucléotides
10 peuvent aussi se fixer sur le support solide par un groupe terminal ou l'un des groupes fonctionnels, notamment amine ou hydroxyle substitués sur les monomères.

Ce couplage entre les groupes fonctionnels du bras de liaison,
15 notamment du fragment homopolynucléotidique ou analogue de polynucléotides, et les groupes fonctionnels du support peut se faire par couplage chimique en présence d'agents d'activation conventionnels. En particulier on réalise un couplage chimique à un support polyfonctionnel en présence d'un agent d'activation de type carbodiimide, telle que l'EDC.

20

La présente invention a également pour objet un procédé d'immobilisation sur phase solide d'une amorce utile dans la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon la présente invention, caractérisé en ce que l'on réalise un couplage covalent entre ledit support
25 fonctionnalisé et ladite molécule polyfonctionnelle liée à l'extrémité 5' de ladite amorce.

Le support solide peut être la surface intérieure du récipient de réaction de PCR, ou un élément solide que l'on introduit dans le récipient
30 avant la réaction, tel que des billes. On cite en particulier comme support solide les surfaces intérieures des puits de microplaques de microtitrage ou des tubes de dosages.

Le format préféré est celui de la microplaque. En effet, sa large utilisation et tous les appareils existant déjà autour de ce format en permettent rapidement et aisément l'automatisation. Deux types de microplaque sont couramment utilisés. Le premier est de type standard
5 avec des cupules cylindriques à fond plat. Le second comporte non pas des cupules cylindriques comme précédemment, mais des puits en forme de petit tube tronqué à fond plat. Cette forme de tube permet de s'adapter facilement au cycleur thermique et permet une excellente conduction thermique.

10

La présente invention a également pour objet un procédé d'immobilisation sur phase solide d'une amorce utile dans la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon la présente invention, caractérisé en ce que l'on réalise un couplage covalent entre ledit support
15 fonctionnalisé et ladite molécule polyfonctionnelle liée à l'extrémité 5' de ladite amorce.

20

L'amplification en phase solide permet d'effectuer l'amplification et la détection sur le même support. La détection du produit d'amplification allongé sur la surface solide peut se faire de différentes façons. Le double
brin fixé au support peut être détecté soit par la mise en évidence d'un marqueur incorporé lors de la PCR, notamment par l'intermédiaire d'une deuxième amorce marquée, soit par l'utilisation d'un agent intercalant de type bromure d'éthidium, YOYO, TOTO, POPO (Molecular Probes Réf. 6 à 8).
25 Après dénaturation, le simple brin spécifiquement fixé au support solide peut être également détecté par une sonde marquée.

30

La détection consiste par exemple en l'hybridation d'une sonde oligonucléotidique biotinylée qui reconnaît spécifiquement le produit d'amplification allongé sur la plaque. Un conjugué Streptavidine-Alcaline Phosphatase reconnaît l'entité biotine de la sonde hybridée et génère après déphosphorylation d'un substrat, un produit colorimétrique ou
fluorescent.

35

Le mode de fixation de l'amorce selon la présente invention est déterminant pour l'élongation. En effet, si celle-ci possède un bras de liaison selon l'invention, le rendement d'élongation peut être augmenté de 15 fois suivant le type de bras, alors que le taux de fixation demeure constant quelque soit le bras de liaison.

La quantité d'amorce présente en solution dans la réaction d'amplification joue elle aussi un rôle important pour le rendement d'élongation. Afin d'avoir un rendement optimal d'élongation de l'amorce fixée, une PCR déséquilibrée est utilisée (Réf. 9). Lors de la PCR, l'amorce fixée au support solide (amorce A) est également présente en solution mais en quantité inférieure, notamment 8 à 16 fois moins importante que l'autre amorce d'amplification (amorce X). L'amplification s'effectue en deux étapes ; l'amplification est d'abord exponentielle jusqu'à ce que l'amorce A en solution soit épuisée, les amorces A fixées au support solide sont ensuite allongées, l'amplification devient alors arithmétique. La première étape permet d'avoir un nombre de copies important, et permet ainsi une élongation sur le support solide plus efficace. La quantité d'amorce mis en solution est critique car elle détermine à quel moment l'amplification arithmétique commence. Une quantité de l'ordre de 5 à 10 pmole pour l'amorce X et de 8 à 16 fois moins pour l'amorce A donne de bons rendements d'élongation.

Le procédé d'amplification selon la présente invention apporte une réelle amélioration par rapport aux techniques habituelles de diagnostic utilisant la PCR, que ce soit pour les maladies infectieuses ou génétiques. Par ailleurs, le procédé selon l'invention permettant d'attacher spécifiquement un seul brin à la phase solide, il peut être aussi intéressant pour le séquençage, spécialement lorsque de grosses quantités doivent être séquencées et qu'une simplification des protocoles et une automatisation s'avèrent indispensables.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de l'exemple détaillé de réalisation qui va suivre.

La figure 1 représente les différentes étapes de la PCR en phase solide.

- 5 X——— : amorce X en solution
 A——— : amorce A en solution
 X=====A : produit d'amplification
 vvvA—— : amorce A fixée

10 La figure 2 représente le rendement de fixation en pM de l'amorce en fonction de différents bras de liaison.

La figure 3 représente les taux d'élongation en unité de fluorescence en fonction de différents bras de liaison.

15 La figure 4 représente le rendement d'élongation en fMole d'antisonde hybridée.

20 La figure 5 représente l'influence de la taille du bras de liaison sur le taux d'élongation.

La figure 6 représente l'influence de différentes fonctions chimiques du bras de liaison sur le taux d'élongation.

25 Le procédé selon l'invention a été appliqué sur un modèle HLA-DRB (Réf. 10 et 11). Des clones de M13 comportant un insert de 280 pb correspondant au produit d'amplification ont été utilisés comme cible. Ce modèle HLA-DRB a permis de mettre en évidence les paramètres importants intervenant dans l'élongation et d'étudier tout particulièrement le problème de spécificité de cette technique.

30

1) Exemples de différents bras de liaison utilisés.

	A,	A-Ph		
	A-5T,	A-10T	A-20T	A-30T
5	A-5T-Ph,	A-10T-Ph		
	A-5A,	A-10A		
	A-5A-Ph,	A-10A-Ph		
	A-5C,	A-10C		
	A-5C-Ph,	A-10C-Ph		

10

A = amorce fixée : CCCCACAGCACGTTTC(T,C)TG

Ph = Groupement phosphate 5' terminal

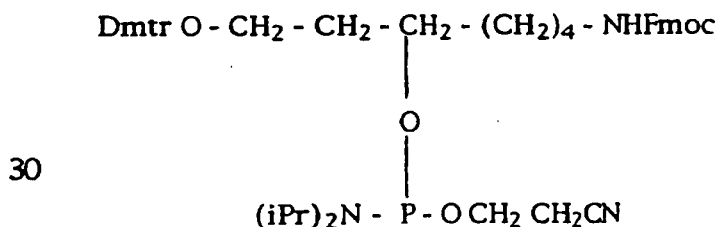
xT, xA, xC = queue en position 5' terminal de x base T, de x base A ou de x base C respectivement.

15

On a aussi utilisé (figure 6) les bras de liaison comprenant des fragments polymères du type analogues de polynucléotides :

- 20
- A - NH₂*
 - A - 5T - 5 NH₂*
 - A - (TEG)₃*
 - A - (TEG)₃* Ph

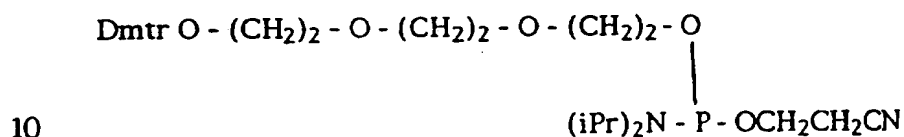
25 Le bras - NH₂* correspond ici à un bras alkyl aminé introduit via le synthon Unilink® Amino Modifier de Clontech de formule :



35 Le bras - 5T - 5 NH₂* correspond à la condensation successive de 5 nucléotides T puis 5 synthons Unilink® dans une synthèse du type phosphoramidite.

La condensation de synthons Unilink® conduit à un fragment analogue de polynucléotide avec des restes alkylamines greffées sur les monomères.

- 5 - (TEG)₃* correspond à la condensation du synthon de Glen Research (Ref : 10-1909 x) de formule :



- (TEG)₃* - Ph est obtenu par une phosphorylation en 5' terminale du conjugué A - (TEG)₃* selon la synthèse phosphoramidite.

15 2) Support solide

Deux types de support thermo-résistants polyfonctionnalisés fournis par la société Nunc, ont été utilisés pour effectuer l'évaluation des différents bras de liaison. Le type I est un polystyrène modifié thermo-résistant et le type II est un copolymère styrène-acrylonitril. Ils ont un format de microplaque et sont mis à cycler dans un thermocycleur fournis par Nunc.

20

Ces supports plastiques ont été fonctionnalisés par un traitement Corona ou irradiation gamma, qui consiste de façon classique à envoyer des décharges électriques dans une enceinte à atmosphère contrôlée et à pression fixe. Cette fonctionnalisation permet de rendre le support plastique capable de fixer des amorces oligonucléotidiques. Ce traitement fait apparaître, à la surface du plastique, des groupements fonctionnels de type amine, alcool, aldéhyde, cétone, acide carboxylique, thiol... qui réagissent chimiquement avec l'oligonucléotide pour former une liaison stable. Les types de liaisons formées, quoique très thermorésistantes, sont toutefois pour l'instant mal connues.

25

30

On réalise le couplage chimique en présence d'un agent activateur selon le protocole suivant.

10 à 100 pmole d'oligonucléotides sont mis à fixer par puits en présence d'éthyl carbodiimide (EDC) 10 à 50mM final et de N-Méthyl Imidazole 10 à 50mM final pH 7, dans un volume final de 100 μ l. Les plaques sont incubées 5 à 15 heures à 50°C puis lavées 4 fois avec une solution 0,4 N NaOH et 0,25 % tween 20 chauffées à 50°C.

10 3) Elongation de l'amorce sur la phase solide

L'élongation se fait dans un volume final de 50 μ l par puits. L'ADN cible 15 à 100 ng est amplifié dans un mélange comprenant du tampon 1X PCR Buffer II (Perkin Elmer), 0,25 mM $MgCl_2$ (Sigma), 200 μ M de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmacia), 80 ng d'amorce X (CCGCTGCACTGTGAAGCTCT) et 10ng d'amorce A avec ou sans linker et 1,2 unité de Taq polymérase (Perkin Elmer). L'amorce X se trouve en solution uniquement alors que l'amorce A est fixée au support solide et en solution. L'amplification se fait sur un thermocycleur adapté au format microplaque en utilisant la méthode suivante :

cycle 1 :
5 min. à 94°C
cycle 2 à 30 :
25 30 sec à 94°C
30 sec. à 55°C
30 sec. à 72°C
cycle 31 :
5 min. à 72°C
30 4°C

La figure 1 représente les différentes étapes de la PCR en phase solide. Après amplification, les produits d'amplification allongés sur la phase solide sont dénaturés. Les puits sont vidés puis lavés 3 fois avec de la soude 0,4M pendant 10 min.

4) Détection

Deux types de détection ont été utilisés. Une détection enzymatique semi-quantitative et une détection radioactive quantitative.

La détection enzymatique se réalise comme décrit dans la littérature (9). Dans cette méthode, après dénaturation 1pM de sonde biotinylée complémentaire à une région du brin allongé sur le support solide est hybridée.

L'hybride est révélée par un conjugué streptavidine - alkalyne phosphatase qui transforme un substrat en un produit colorimétrique fluorescent ou chimiluminescent.

Pour la détection radioactive, une sonde marquée au P^{32} est hybridée sur le brin allongé au support solide et la radioactivité est comptée dans un compteur β .

5) Résultats

La capacité de fixation de l'amorce sur le support solide a été quantifiée par fixation d'amorces kinases radioactivement en 5' et a permis de montrer que le type I fixait de l'ordre de 1 pM d'amorce par puits, tandis que le type II fixait 0,2 pM.

La figure 2 représente la capacité de fixation de l'amorce aux deux supports microplaque en fonction des différents types de bras de liaison. Pour un type de support donné, la capacité de fixation ne varie pas de façon significative en fonction des bras utilisés.

Par contre, le rendement d'élongation varie énormément en fonction du bras de liaison employé. Les résultats sont présentés aux figures 3 et 5 qui représentent les taux d'élongation des supports en fonction des différents bras utilisés. L'influence du bras attaché à

l'amorce est déterminante pour le rendement d'élongation qui peut être augmenté de 15 fois suivant le type de linker utilisé, le taux de fixation demeurant constant.

5 Les fragments poly-A et poly-C sont plus efficaces que les poly-T. En effet, pour des bras de liaison de même taille ils donnent, pour l'élongation, des signaux plus forts. L'ajout d'un groupement phosphate améliore toujours le rendement d'élongation et cette augmentation est plus sensible avec les bras de liaison poly-T qu'avec les bras de liaison
10 poly-A ou poly-C.

L'élongation a été quantifiée indirectement par hybridation de sondes radioactives complémentaires à la partie allongée par PCR. Le taux d'hybridation a été vérifié en hybridant des sondes radioactives à des puits
15 ayant une quantité connue d'amorces fixées. Le taux d'élongation varie suivant le type de bras de liaison utilisé, entre 2fM et 38fM ou entre 1fM et 17 fM pour type I et type II, respectivement. Ces résultats sont présentés à la figure 4.

20 La présence de plusieurs groupes fonctionnels au sein du bras de liaison permet d'augmenter le taux d'élongation de l'amorce fixée au support solide. Ainsi comme le montre la Figure 6, on remarque une augmentation de 45 % l'orsqu'on intercale 10T entre l'amorce et un groupement phosphate terminal. De même, le fait de rajouter une fonction
25 phosphate à un bras de liaison $(\text{TEG})_3^*$ permet d'augmenter le signal de 40 % et de 350 % par rapport à l'amorce seule sans bras de liaison. Le même phénomène est constaté lorsqu'un bras 5T5NH_2^* est utilisé, le taux d'élongation est augmenté de 110 % par rapport à un bras NH_2^* . L'utilisation de plusieurs fonctions chimiques différentes permet donc de
30 favoriser l'élongation de l'amorce sur la phase solide en augmentant les types de liaisons terminales.

- La quantité d'oligonucléotides allongées est en fait très faible par rapport à la quantité fixée sur le support. Malgré cette faible quantité, on parvient à des rapports signal sur bruit de l'ordre de 30 avec la technique de détection enzymatique décrite ce qui est tout à fait suffisant pour une
- 5 application diagnostique.

BIBLIOGRAPHIE

1. "Covalent immobilization DNA onto Polystyrene microwells : the
5 molecules are only bound at the 5' end" . S.R. Rasmussen, et al. Anal.
Biochem. 198, 138-142, (1991).
2. "A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA".
G. H. KELLER, et al. Anal. Biochem. 177, 27-32 (1989).
- 10 3. "Immobilization of DNA via oligonucleotides containing an
aldehyde or carboxylic acid group at the 5' terminus". J.N. Kremsky et al.
Nucleic Acid Res. Vol. 15, Num.7, 2891-2909, (1987).
- 15 4. "Detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA in
plasma from high risk pediatric patients by using the self sustained
sequence replication reaction". C.E. Bush, J. Clin. Microbiol. 30, 281-286,
(1992).
- 20 5. "Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-
specific oligonucleotide probes". R.K. Saiki, et al. pNAS 86, 6230-6234
(1989).
- 25 6. "Use of the fluorescent dye YOYO-1 to quantifie oligonucleotides
immobilized on plastic plates". M. Ogura, et al. Biotechniques 16, 1032
(1994).
- 30 7. "Stable dye-DNA intercalaton complexes as reagents for high-
sensitivity fluorescent detection". A.N. Glazer, H.S. Rye, Nature 359, 859
(1992).
- 35 8. "Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-
stranded DNA and RNA with picogram sensitivity." H.S. Rye, et al. Anal.
Biochem. 208, 144 (1993).

9. "Combined polymerase chain reaction-hybridization microplate assay used for detection of bovine leukemia virus and salmonella". S.R. Rasmussen, et al. Nucleic Acid Research, (1994).
- 5 10. "Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region". J. Trowsdale, et al. Immuno. Rev., 1985, 85: 5-43.
11. "HLA class II nucleotide sequences, 1992." J.G. Bodmer. Eur. J. Immunogen., 1993, 20:47-79.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'acides nucléiques en phase solide dans lequel on utilise une amorce immobilisée sur un support solide thermo-
5 résistant fonctionnalisé, caractérisé en ce que ladite amorce est immobilisée sur le support solide par l'intermédiaire d'un bras de liaison consistant en une molécule polyfonctionnelle établissant un lien covalent entre le support solide et un premier groupe fonctionnel de ladite
10 molécule polyfonctionnelle, et entre l'extrémité 5' de ladite amorce et un deuxième groupe fonctionnel de ladite molécule polyfonctionnelle.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite molécule polyfonctionnelle comprend un fragment polymère.

15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que chaque unité monomérique dudit fragment polymère comporte au moins un groupe fonctionnel.

20 4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que ledit fragment polymère comporte au moins 5 de préférence au moins 10 monomères.

25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits groupes fonctionnels de la molécule, notamment du fragment polymère sont choisis parmi les groupes amine, hydroxyl, carboxyl, aldehyde, thiol ou phosphate.

30 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que lesdits groupes fonctionnels sont choisis parmi les groupes amine, hydroxyl ou phosphate.

35 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite molécule polyfonctionnelle comprend un fragment polymère de type homopolynucléotide ou un fragment d'un analogue de polynucléotide.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le fragment polymère est un homopolynucléotide comportant entre 10 et 50 nucléotides.

5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ladite molécule polyfonctionnelle comprend un fragment polymère analogue de polynucléotide de formule :



15 où R est un reste aliphatique portant au moins un groupe fonctionnel et n est un entier de 2 à 50.

20 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit fragment polymère analogue de polynucléotide comporte plusieurs groupes amine ou hydroxyl greffés sur chaque monomère.

11. Procédé selon l'une des revendications 2 à 10, caractérisé en ce que le fragment polymère comporte un groupe phosphate terminal à son extrémité qui n'est pas liée à l'amorce.

25 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le support solide est constitué d'un polymère organique ou inorganique.

30 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le support solide est un matériau plastique thermo-résistant fonctionnalisé par traitement corona ou irradiation gamma.

35 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le support solide est constitué par du polystyrène modifié thermo-résistant tel qu'un copolymère styrène-acrylonitrile ou du polycarbonate.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'amorce fixée au support solide est également présente en solution, mais en quantité moins importante que l'autre amorce en solution lors de la réaction d'amplification.

5

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'amorce fixée au support solide est également présente en solution en quantité 8 à 16 fois inférieure à celle de l'autre amorce en solution.

10

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le support solide est constitué par la surface intérieure du récipient dans lequel on effectue l'amplification.

15

18. Trousse de réactifs pour la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisée en ce qu'elle comporte ledit support solide sur lequel est immobilisée une amorce par l'intermédiaire d'un lien covalent avec une dite molécule polyfonctionnelle notamment un dit fragment polymère.

20

19. Procédé d'immobilisation sur phase solide d'une amorce utile dans la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que l'on réalise un couplage covalent entre ledit support fonctionnalisé et ladite molécule polyfonctionnelle liée à l'extrémité 5' de ladite amorce

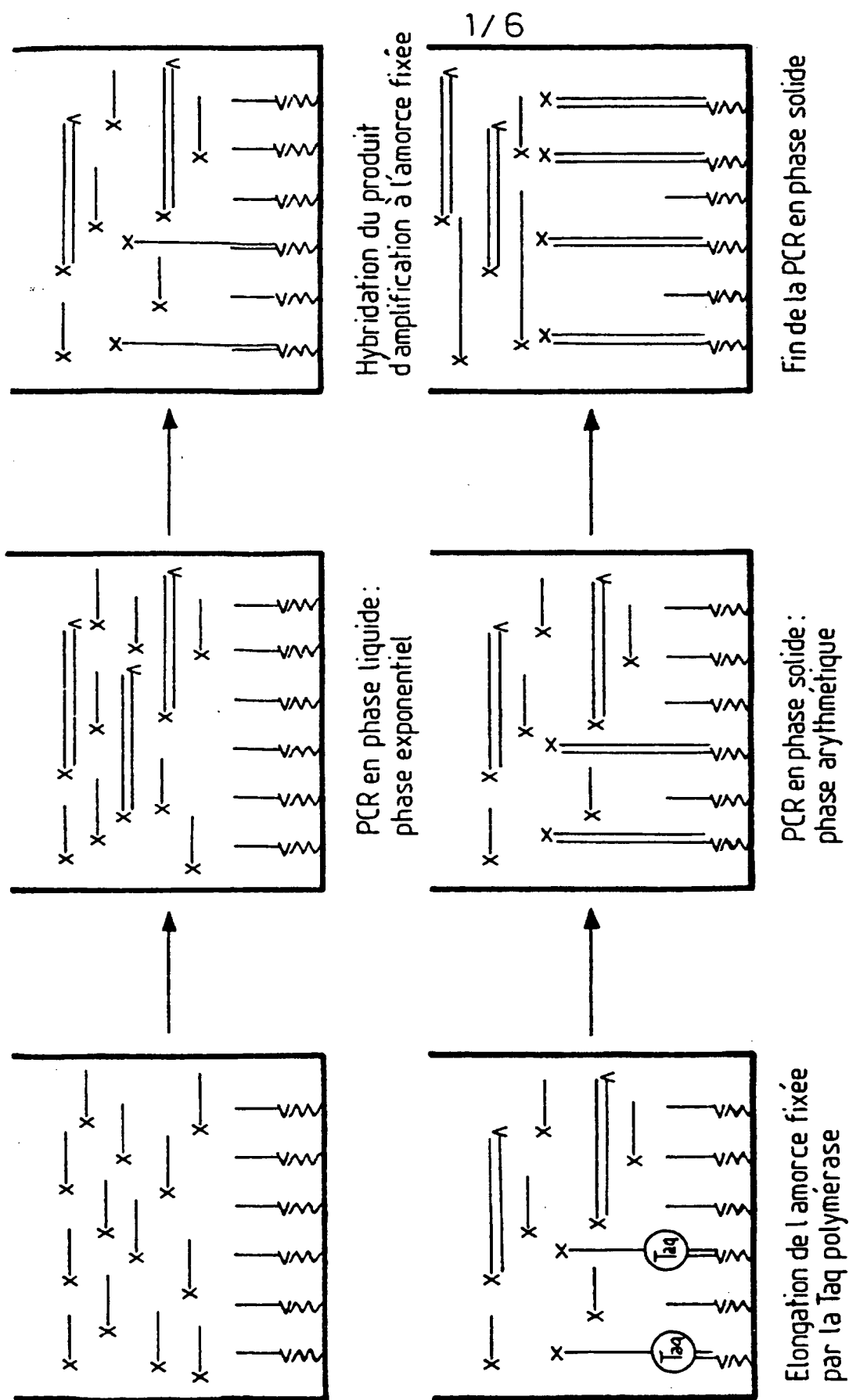
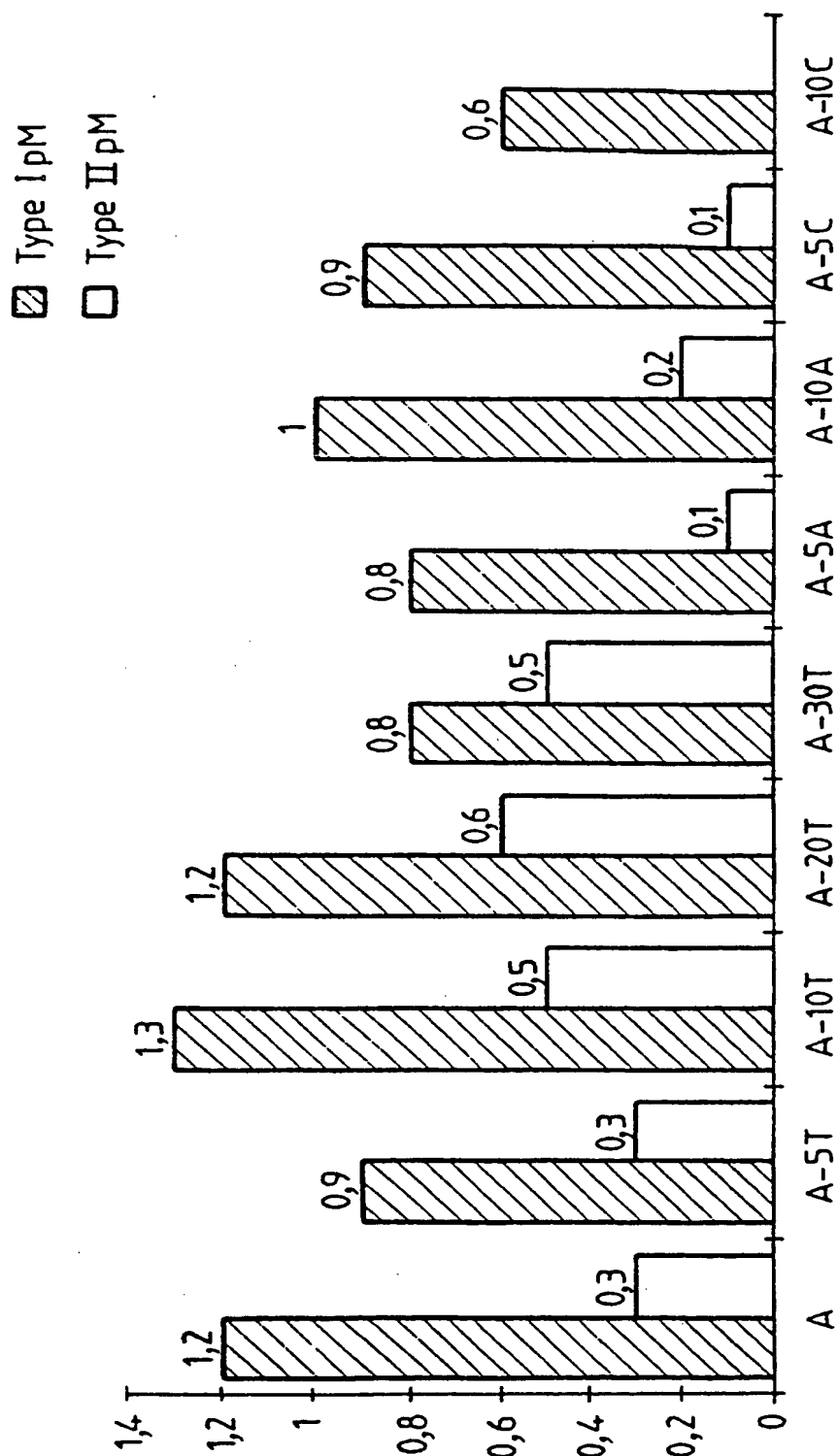


FIG.1

2/6

FIG. 2

3/6

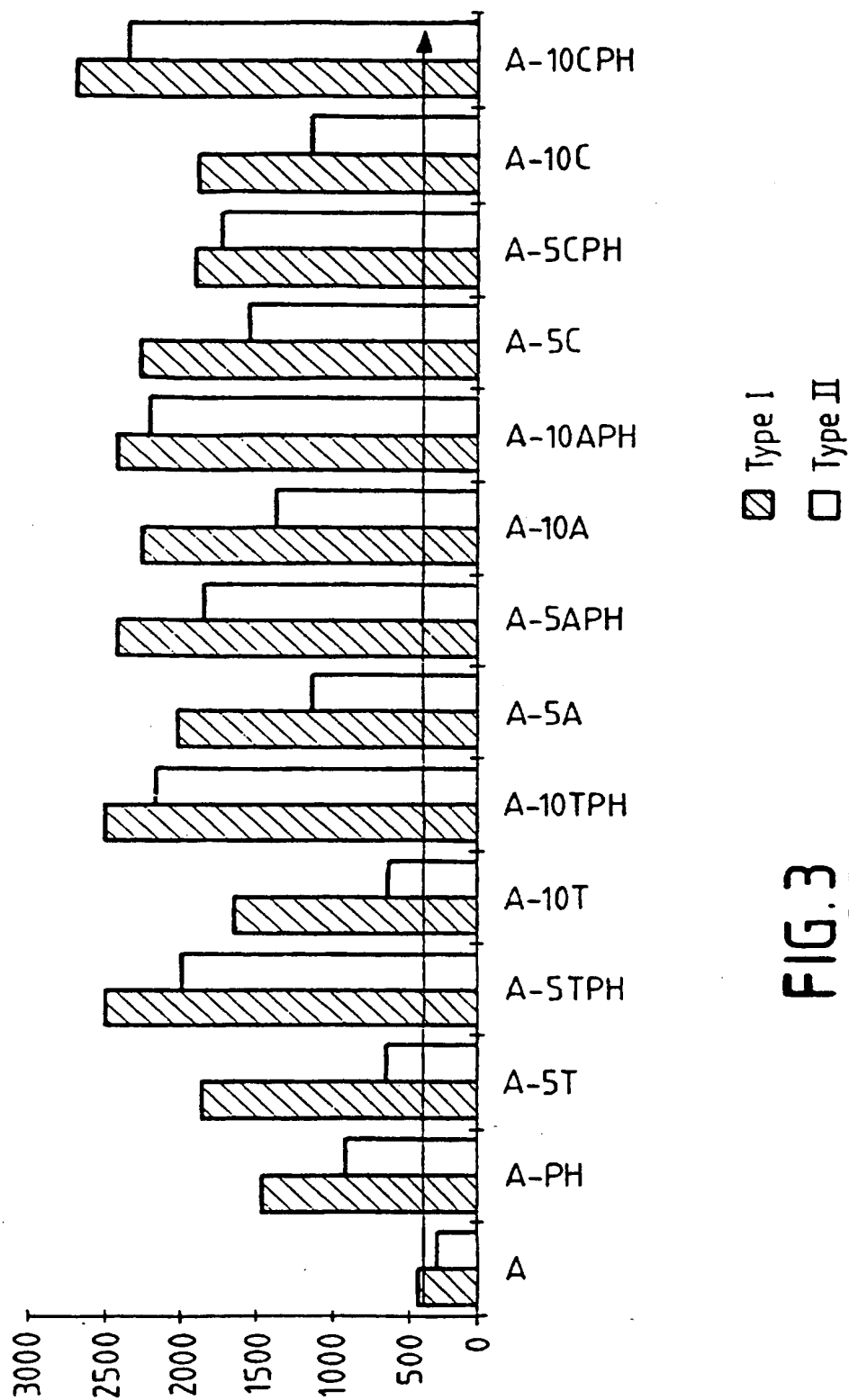
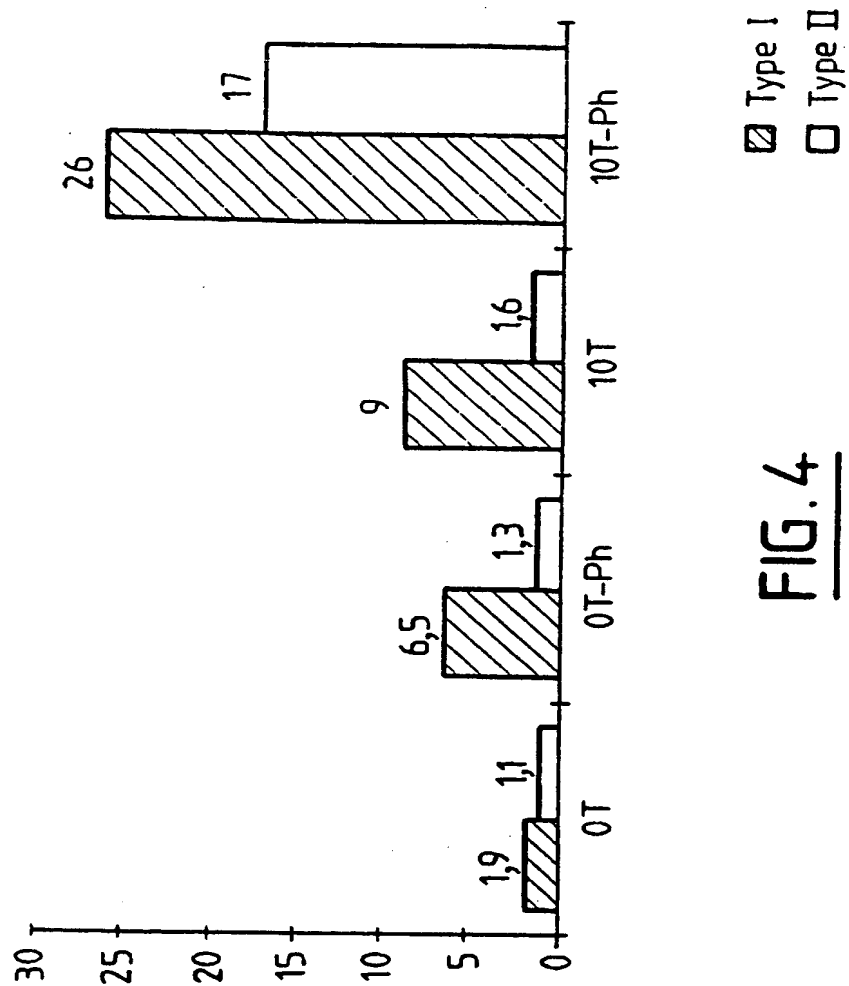
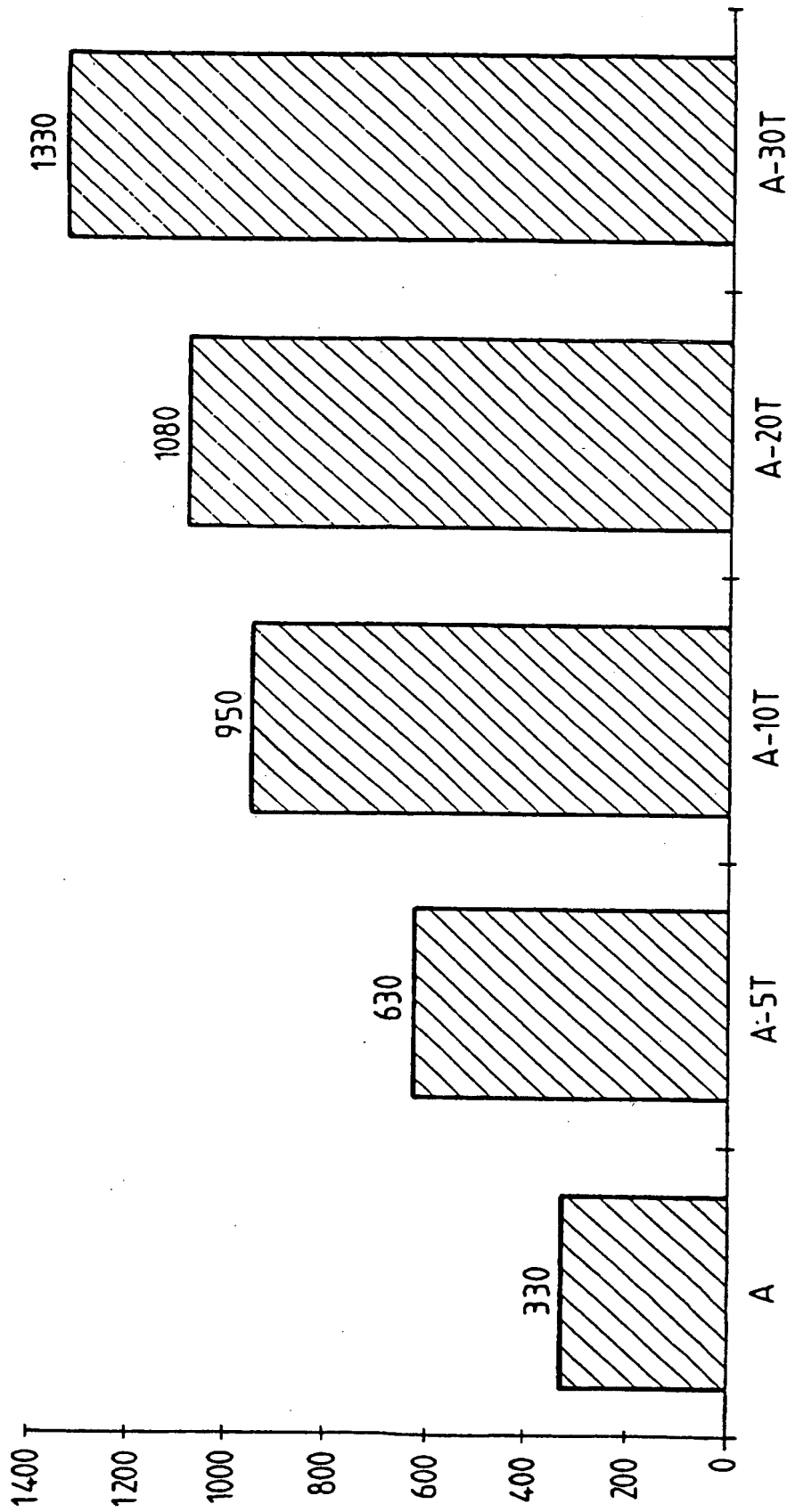


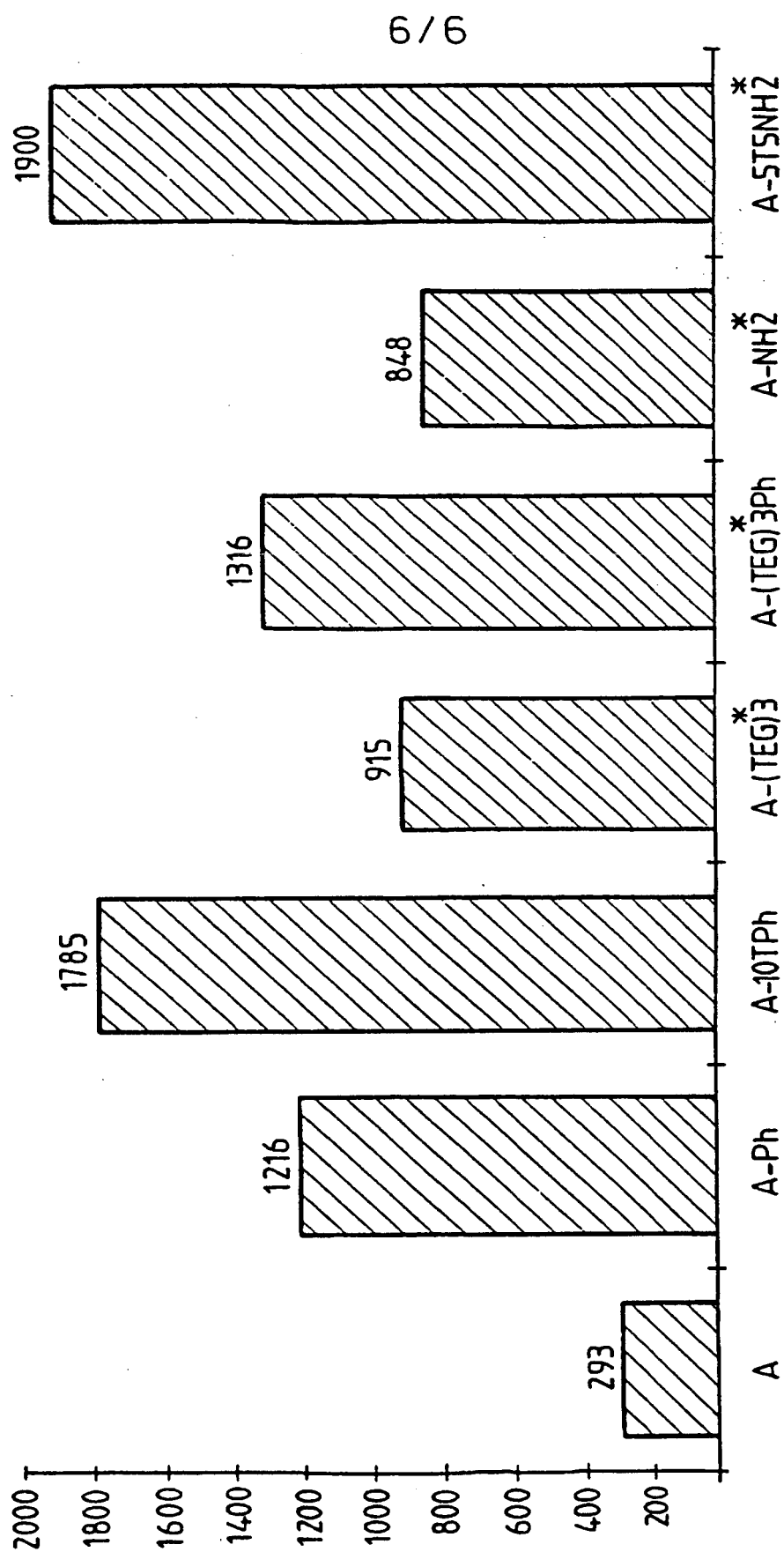
FIG. 3

4/6

FIG. 4

5/6

FIG. 5

FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/Fr 95/01422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 15228 (HITACHI CHEMICAL CO.) 5 August 1993 see figures 2,3; example 1 ---	1-19
A	WO,A,93 09250 (ADELAIDE CHILDREN'S HOSPITAL) 13 May 1993 see the whole document ---	1-19
A	WO,A,93 13220 (TEPNEL MEDICAL LTD) 8 July 1993 see claims 1-9,13-16,20-25; figures 3-9 ---	1-19
A	WO,A,93 04199 (SCIENTIFIC GENERICS LTD.) 4 March 1993 see the whole document ---	1-19
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 February 1996

Date of mailing of the international search report

06. 03. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/Fr 95/01422

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 03052 (ARIZONA BOARD OF REGENTS FOR AND ON THE BEHALF OF THE UNIV. OF ARIZONA) 18 February 1993 see page 7, line 15 ---	1-19
A	WO,A,91 00868 (NAT. RES. DEV. CORP.) 24 January 1991 see the whole document ---	1-19
A	WO,A,90 01546 (MICROPROBE CORP.) 22 February 1990 see page 35, line 23 - line 25 ---	1
A	EP,A,0 480 408 (TOYO JOZO CO LTD.) 15 April 1992 see example 9 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/Fr 95/01422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9315228	05-08-93	CA-A- 2128891 EP-A- 0675965	05-08-93 11-10-95
WO-A-9309250	13-05-93	BR-A- 9206705 CA-A- 2122450 EP-A- 0672173	21-11-95 13-05-93 20-09-95
WO-A-9313220	08-07-93	AU-B- 3169493 CA-A- 2126748 EP-A- 0620863 FI-A- 943054 JP-T- 7502405 NO-A- 942399 ZA-A- 9210008	28-07-93 25-06-93 26-10-94 22-08-94 16-03-95 12-08-94 03-08-93
WO-A-9304199	04-03-93	NONE	
WO-A-9303052	18-02-93	US-A- 5437976 EP-A- 0668867	01-08-95 30-08-95
WO-A-9100868	24-01-91	GB-A- 2233654	16-01-91
WO-A-9001546	22-02-90	NONE	
EP-A-480408	15-04-92	JP-A- 4148697 DE-D- 69112977	21-05-92 19-10-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FK 95/01422

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 15228 (HITACHI CHEMICAL CO.) 5 Août 1993 voir figures 2,3; exemple 1 ---	1-19
A	WO,A,93 09250 (ADELAIDE CHILDREN'S HOSPITAL) 13 Mai 1993 voir le document en entier ---	1-19
A	WO,A,93 13220 (TEPNEL MEDICAL LTD) 8 Juillet 1993 voir revendications 1-9,13-16,20-25; figures 3-9 ---	1-19
A	WO,A,93 04199 (SCIENTIFIC GENERICS LTD.) 4 Mars 1993 voir le document en entier ---	1-19
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 Février 1996

Date d'expiration du présent rapport de recherche internationale

06. 03. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01422

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 03052 (ARIZONA BOARD OF REGENTS FOR AND ON THE BEHALF OF THE UNIV. OF ARIZONA) 18 Février 1993 voir page 7, ligne 15 ---	1-19
A	WO,A,91 00868 (NAT. RES. DEV. CORP.) 24 Janvier 1991 voir le document en entier ---	1-19
A	WO,A,90 01546 (MICROPROBE CORP.) 22 Février 1990 voir page 35, ligne 23 - ligne 25 ---	1
A	EP,A,0 480 408 (TOYO JOZO CO LTD.) 15 Avril 1992 voir exemple 9 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 95/01422

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9315228	05-08-93	CA-A- 2128891	05-08-93
		EP-A- 0675965	11-10-95
WO-A-9309250	13-05-93	BR-A- 9206705	21-11-95
		CA-A- 2122450	13-05-93
		EP-A- 0672173	20-09-95
WO-A-9313220	08-07-93	AU-B- 3169493	28-07-93
		CA-A- 2126748	25-06-93
		EP-A- 0620863	26-10-94
		FI-A- 943054	22-08-94
		JP-T- 7502405	16-03-95
		NO-A- 942399	12-08-94
		ZA-A- 9210008	03-08-93
WO-A-9304199	04-03-93	AUCUN	
WO-A-9303052	18-02-93	US-A- 5437976	01-08-95
		EP-A- 0668867	30-08-95
WO-A-9100868	24-01-91	GB-A- 2233654	16-01-91
WO-A-9001546	22-02-90	AUCUN	
EP-A-480408	15-04-92	JP-A- 4148697	21-05-92
		DE-D- 69112977	19-10-95